PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/67279
C07K 5/083, A61K 38/06	A1	(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Dezember 1999 (29.12.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/04381

(22) Internationales Anmeldedatum: 24. Juni 1999 (24.06.99)

(30) Prioritätsdaten:
198 28 114.5 24. Juni 1998 (24.06.98) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: PROBIODRUG GESELLSCHAFT FÜR ARZNEIMITTELFORSCHUNG MBH [DE/DE]; Weinbergweg 22, D–06120 Halle (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: DEMUTH, Hans–Ulrich [DE/DE]; Hegelstrasse 14, D–06114 Halle (DE). SCHMIDT, Jörn [DE/DE]; Eichendorffstrasse 2, D–06114 Halle (DE). HOFFMANN, Torsten [DE/DE]; Körnerstrasse 8, D–06114 Halle (DE). GLUND, Konrad [DE/DE]; Rüsternweg 37, D–06120 Halle (DE).

(74) Anwälte: FORSTMEYER, Dietmar, G. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D–81541 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: COMPOUNDS OF UNSTABLE DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV INHIBITORS

(54) Bezeichnung: VERBINDUNGEN VON INSTABILEN DP IV–INHIBITOREN

(57) Abstract

The invention relates to compounds of unstable inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) which comprise general formula A–B–C, whereby A represents an amino acid, B represents the chemical bond between A and C or an amino acid, and C represents an unstable inhibitor of DP IV. Such compounds are used for treating altered glucose tolerance, glucosuria, hyperlipidemia, metabolic acidoses, diabetes mellitus, diabetic neuropathy, nephropathy, and secondary diseases in mammals caused by diabetes mellitus.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen von instabilen Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV), welche Verbindungen die allgemeine Formel A–B–C aufweisen, wobei A eine Aminosäure, B die chemische Bindung zwischen A und C oder eine Aminosäure, und C ein instabiler Inhibitor von DP IV ist. Derartige Verbindungen werden zur Behandlung von beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern verwendet.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verbindungen von instabilen DP IV-Inhibitoren

Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen von instabilen Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV), welche Verbindungen die allgemeine Formel A-B-C aufweisen, wobei

A eine Aminosäure
B die chemische Bindung zwischen A und C oder eine Aminosäure, und
C ein instabiler Inhibitor von DP IV ist.

Es ist bekannt, daß Aminoacyl Thiazolidide, Aminoacyl Pyrrolidide, N-Dipeptidyl, O-Acyl Hydroxylamine und andere Verbindungen als Inhibitoren des Serumenzyms Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV) und analoger Enzyme wirken [vgl. DEMUTH, H.-U., J. Enzyme Inhibition 3, 249 (1990); DEMUTH, H.-U., HEINS, J., in *Dipeptidyl Peptidase IV* (B. Fleischer, Ed.) R.G. Landes, Biomedical Publishers, Georgetown, 1995, 1-37].

Es wurde gefunden, daß mittels stabiler Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV die T-Zell-vermittelte Immunantwort z. B. bei Transplantationen beeinflußt wird [vergl. KOROM, S., DEMEESTER, I., STADLBAUER, T.H.W., CHANDRAKER, A., SCHAUB, M., SAYEGH, M.H., BELYAEV, A., HAEMERS, A., SCHARPE, S., KUPIEC-WEGLINSKI, J.W., Inhibition of CD26/dipeptidyl peptidase IV activity in vivo prolongs cardiac allograft survival in rat recipients, Transplantation 63, 1495 (1997)]. Weiter kann rheumathische Arthritis [vergl. TANAKA, S., MURAKAMI, T., HORIKAWA, H., SUGIURA, M., KAWASHIMA, K., SUGITA,T., Suppression of arthritis by the inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. Int. J. Immunopharmacol. 19, 15 (1997)] unterdrückt werden kann.

Es wurde weiter gefunden, daß durch Verabreichung von stabilen Inhibitoren (Effektoren) der DP IV bzw. DP IV-analoger Enzym-

BESTÄTIGUNGSKOPIE

aktivität im Blut eines Säugers, durch deren damit verbundene, temporäre Aktivitätsreduktion, in kausaler Folge die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide Gastric Inhibitory Polypeptide 1-42 (GIP_{1-42}) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 ($GLP\text{-}1_{7-36}$) (o.a. $GLP\text{-}1_{7-37}$ oder deren Analoga) durch DP IV- und DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut werden und damit die Konzentrationsabnahme dieser Peptidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert wird. Die durch die Wirkung von DP IV-Effektoren erzielte, erhöhte Stabilität der (endogen vorhandenen oder exogen zugeführten) Incretine oder ihrer Analoga, die damit vermehrt für die insulinotrope Stimulierung der Incretin-Rezeptoren der Langerhansschen Zellen im Pankreas zur Verfügung stehen, verändert u.a. die Wirksamkeit von körpereigenem Insulin, was eine Stimulierung des Kohlehydratstoffwechsels des behandelten Organismus nach sich zieht. Als Resultat sinkt der Blutzuckerspiegel unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum des behandelten Organismus. Dadurch können mittels DP IV - Inhibitoren Stoffwechselanomalien wie Übergewicht, Glukosurie, Hyperlipidämie sowie mögliche schwere metabolische Azidosen, Diabetes mellitus, die eine Folge längerer, erhöhter Glukosekonzentrationen im Blut sind, verhindert bzw. gemildert werden [vgl. DE 196 16 486].

Mit Hilfe von DP IV - Inhibitoren kann auch das Eindringen von HIV in CD 26 (DP IV) positive Zellen experimentell verhindert werden [vergl. WAKSELMAN, M., NGUYEN, C., MAZALEYRAT, J.-P., CALLEBAUT, C., KRUST, B., HOVANESSIAN, A.G., Inhibition of HIV-1 infection f CD 26+ but not CD26- cells by a potent cyclopeptidic inhibitor of the DPP IV activity of CD 26. Abstract P 44 of the 24th European Peptide Symposium 1996].

Weiterhin wurde festgestellt, daß DP IV neuroaktive Peptide wie Neuropeptid Y und CLIP in ihrer Aktivität modulieren kann [vergl. MENTLEIN, R., DAHMS, P., GRANDT, D., KRUGER,R., Pro-

teolytic processing of neuropeptide Y and peptide YY by dipeptidyl peptidase IV. Regul. Pept. 49, 133 (1993); WETZEL, W., WAGNER, T., VOGEL, D., DEMUTH, H.-U., BALSCHUN, D., Effects of the CLIP fragment ACTH 20-24 on the duration of REM sleep episodes. Neuropeptides, 31, 41 (1997)].

Diese vielseitigen Wirkungen von DP IV-Inhibitoren implizieren, daß sich ihre Wirkungen bei Anwendungen in einem bestimmten pathophysiologischen Zustand eines Gewebes auf andere, normale physiologische Zustände z.B. in anderen Organen auswirken können. Diese Auswirkungen können sowohl positive als auch negative Folgen für den Zielorganismus haben.

Es ist daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Effektoren von DP IV bereitzustellen, die in bestimmten Zielgeweben oder Zielorganen eine hohe Bioverfügbarkeit von DP IV Inhibitoren und eine genau definierte Wirkungsdauer aufweisen.

Es war insbesondere die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Inhibitoren von DP IV bereitzustellen, die bei einer hohen Bioverfügbarkeit eine kurze genau definierte Wirkungsdauer aufweisen.

Diese Aufgaben werden durch die Bereitstellung von Verbindungen von instabilen Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV) gelöst, welche Verbindungen die allgemeine Formel A-B-C aufweisen, wobei

A eine Aminosäure
B die chemische Bindung zwischen A und C oder eine Aminosäure, und
C ein instabiler Inhibitor von DP IV ist.

Stellt B eine Bindung dar, so ist es insbesondere eine Peptidbindung; stellt B eine Aminosäure dar, so ist diese vorzugsweise über Peptidbindungen mit A und C verknüpft.

Erfindungsgemäß können diese Verbindungen als Inhibitoren von DP IV eingesetzt werden, wobei der Ort ihrer Wirkung, der Zeitpunkt des Wirkungseintritts und die Dauer der Wirkung genau definiert werden kann:

Bei ihrer Verabreichung werden die Verbindungen z.B. durch geeignete Enzyme gespalten und so die instabilen Inhibitoren "C" unter Abspaltung der Gruppen A-B freigesetzt. Die Freisetzung der Inhibitoren erfolgt dabei sowohl durch chemische als auch durch enzymatische Mechanismen. Beispielsweise dienen Esterasen, Proteasen und Peptidasen zur Wirkstoff-Freisetzung aus erfindungsgemäßen Verbindungen. Derartige Esterasen, Proteasen etc. sind z.B. in den WO 97/45117, US 5433955, US 5614379, US 5624894 offenbart.

Die freigesetzten instabilen Inhibitoren können dann mit der vor Ort vorliegenden DP IV in Wechselwirkung treten und sie inhibieren. In kausaler Folge wird dadurch z.B. ein verminderter Abbau der vorstehend bezeichneten insulinotropen Peptide erreicht und dadurch die Wirksamkeit von Insulin erhöht wird.

Die Verabreichung von instabilen Inhibitoren der DP IV an sich hat sich zur Inhibierung von DP IV als nachteilig erwiesen, da sie sich in vivo sehr schnell zersetzen und somit eine gleichmäßige Verteilung der Inhibitoren insbesondere im menschlichen Organismen unmöglich ist. Insbesondere bei oraler Verabreichung sind derartige Inhibitoren so labil, daß sie nahezu wirkungslos bleiben. Daher wurden bisher insbesondere zur Behandlung von Diabetes mellitus stabile Inhibitoren eingesetzt.

Überraschenderweise ist nun gefunden worden, daß instabile Inhibitoren "C" dadurch ausreichend stabilisiert werden können, daß sie mit Gruppen der Formel A-B zu Verbindungen der Formel A-B-C maskiert werden.

Diese Stabilisierung ist auch insofern überraschend, als eine Verbindung der Formel A-B-C, die eine Carbonylmethylpyridiniumgruppe aufweist, am Pyridiniumstickstoffatom positiv geladen ist. Dadurch wird über die Methylengruppe ein Elektronenzug auf die Gruppe ausgeübt, die nach Abspaltung des Restes A-B das aktive, elektrophile Reaktionszentrum des Inhibitors darstellt, das mit dem nun freigesetzten N-Terminus reagieren kann. Aufgrund der so bewirkten Aktivierung des Reaktionszentrums wäre zu erwarten gewesen, daß dessen Elektrophilie derart gesteigert würde, daß an der Verbindung A-B-C unspezifisch Nukleophile andocken und der Inhibitor inaktiviert wird. Überraschenderweise ist jedoch gefunden worden, daß eine derartige Inaktivierung der Inhibitoren nicht eintritt.

Um mittels DP IV-Inhibitoren in solche physiologischen Regelkreise einzugreifen, die nur eine kurzzeitige Beeinflussung des Zielenzymes DP IV erfordern, werden erfindungsgemäß z.B. Inhibitoren als Komponente C bereitgestellt, die nur eine kurze Wirkungsdauer aufweisen und nach definierbaren Halbwertszeiten in inhibitorisch inaktive chemische Verbindungen übergehen.

Beispielsweise reicht für die Verstärkung des Incretin-Effektes bei Diabetes mellitus eine Wirkungsdauer der Inhibitoren von wenigen Minuten aus, während z.B. die Suppression der DP IV-vermittelten Immunantwort bei Transplantationen eine langfristige Wirkung der Inhibitoren erfordert.

Die erfindungsgemäßen instabilen Inhibitoren zyklisieren nach ihrer Freisetzung z.B. zu einem Piperazinderivat und werden so inaktiviert. Diese Reaktion erfolgt spontan und ist auf den

nukleophilen Angriff des N-terminalen Aminostickstoffs auf die C-terminale Carbonylfunktion des Dipeptid-Derivates zurückzuführen und wird durch die insbesondere in Prolin-haltigen Peptiden erleichterte *cis-trans* Isomerisierung um die Aminosäure-Imidbindung erleichtert.

Darüber hinaus setzt dieser Zerfallsprozess erst dann ein, wenn die Verbindung das gewünschte Zielkompartiment, beispielsweise den Blutkreislauf erreicht und die gewünschte Wirkung entfaltet.

Diese Eigenschaften der erfindungsgemäßen Inhibitoren kann erfindungsgemäß zum Design von unterschiedlichen DP IV-Inhibitoren genützt werden, um nach Freisetzung des DP IV-Inhibitors dessen nunmehr erwünschte, zeitlich definierte Deaktivierung durch intramolekulare Zyklisierung einzuleiten.

Insbesondere werden erfindungsgemäß Verbindungen bevorzugt, in denen C ein Dipeptidderivat mit einer aktiven Carbonylgruppe am C-Terminus darstellt. Vorzugsweise stellt C eine Dipeptidylchloralkylketon-, eine Dipeptidylboronsäure- oder eine Dipeptidylcyanidverbindung oder eine Dipeptidylpyridiniummethylketoverbindung dar. Derartige Inhibitoren haben sich als besonders wirksame instabile DP IV-Inhibitoren herausgestellt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden Verbindungen eingesetzt, in denen B Prolin, Hydroxyprolin, Thiazolidincarbonsäure, Dehydroprolin, Pipecolinsäure, Azetidincarbonsäure oder Aziridincarbonsäure ist, wobei Prolin und Hydroxyprolin besonders bevorzugt werden.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen weisen dabei insbesondere auch den Vorteil auf, daß die Inhibitoren der DP IV je nach individuellem Bedarf der Patienten freigesetzt werden:

Tritt eine erfindungsgemäße Verbindung mit einem DP IV-Molekül in Wechselwirkung, so wird sie durch das Enzym in die Gruppen A-B und den Inhibitor C gespalten. Der Inhibitor C wird das DP IV-Molekül inhibieren, so daß es keine weiteren Verbindungen mehr aufspalten kann. Liegen weitere DP IV-Moleküle vor, so kommt es so lange zur Spaltung der Verbindungen (wenn eine ausreichende Menge an entsprechenden Verbindungen verabreicht wurde), bis das letzte DP IV-Molekül inhibiert ist. Die übrigen Verbindungen werden nicht zersetzt und stellen somit so lange ein Inhibitordepot dar, bis die Konzentration an DP IV-Molekülen wieder ansteigt oder Inhibitormoleküle von der DP IV verdrängt werden bzw. Inhibitormoleküle eliminiert oder inaktiviert werden und es wiederum zu einer Spaltung der erfindungsgemäßen Verbindungen und somit zu einer Freisetzung von Inhibitoren kommt.

Die Erfindung weist also den weiteren Vorteil auf, daß jeder Organismus genau die Menge an Inhibitor freisetzen wird, die zur Inhibierung der individuell in unterschiedlicher Menge vorliegenden DP IV notwendig ist. Liegt bei einem Patienten DP IV z.B. in hohen Konzentrationen vor, so wird eine große Menge an Inhibitor freigesetzt; liegt nur eine wenig erhöhte Konzentration an DP IV vor, so wird nur eine geringe Menge an Inhibitor freigesetzt.

Insbesondere werden Verbindungen bevorzugt, in denen A-B ein Dipeptid der Formel Ile-Pro oder Gly-Pro ist.

Die vorliegende Erfindung betrifft also neue Verbindungen von instabilen Inhibitoren der Serinpeptidase Dipeptidyl Peptidase IV, die zur Behandlung von verschiedenen Erkrankungen insbesondere von mit Diabetes mellitus im Zusammenhang stehenden Stoffwechselerkrankungen eingesetzt werden können.

Überraschenderweise weisen derartige maskierte Inhibitoren gegenüber nicht maskierten Inhibitoren zusätzlich eine erheblich gesteigerte Wirksamkeit auf: Werden identische Mengen von unmaskierten Inhibitoren der DP IV und von erfindungsgemäßen Verbindungen eingesetzt, so kommt es bei Wistarratten durch die erfindungsgemäßen Verbindungen zu einer deutlichen Glukosetoleranzverbesserung.

Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäßen Verbindungen besteht darin, daß der Wirkungseintritt und auch die Wirkungsdauer der DP IV-Inhibitoren durch geeignete Auswahl der Gruppen A-B zeitlich gesteuert werden kann. Insbesondere hängt die Freisetzung der Gruppen A-B aus den erfindungsgemäßen Verbindungen von der Natur des Aminosäurerestes von A ab: Bezüglich der Definition der Gruppe A wurde insbesondere folgende Reihenfolge der Freisetzungsgeschwindigkeit der Reste A-B aus den Verbindungen A-B-C durch DP IV gefunden:
Ile<Val<Phe<Pro<Ala<Gly. Die Geschwindigkeitskonstanten der entsprechenden DP IV-katalysierten Freisetzungen liegen zwischen 1 s^{-1} und 100 s^{-1}. Damit steht ein Mittel zur Verfügung, die DP IV-Inhibitoren zeitlich exakt definiert freizusetzen: Soll die Wirkung der Enzyme sofort, z.B. bei Aufnahme Glukosereicher Nahrung eintreten, so wird eine Verbindung A-B-C gewählt, die als Gruppe A z.B. die Aminosäure Gly aufweist; soll erst eine verzögerte Wirkung des Inhibitors eintreten, so kann als Gruppe A z.B. die Aminosäure Ile ausgewählt werden. DP IV-Inhibitoren können durch die erfindungsgemäßen Verbindungen also insbesondere nahezu verzögerungsfrei, z.B. nahezu gleichzeitig mit aufgenommenen Nahrungsmitteln durch die Dünndarmmucosa transportiert werden.

Ferner kann auch der Freisetzungs- und Wirkungsort der DP IV-Inhibitoren durch die Art der Reste A-B gesteuert werden:

Im Blut von Säugern liegen neben der Dipeptidyl Peptidase IV verschiedene andere Aminopeptidasen wie z. B. Pyroglutamyl

Aminopeptidase und Prolyl Aminopeptidase vor. Durch geeignete Auswahl der Reste A-B kann erfindungsgemäß festgelegt werden, durch welche Aminopeptidase der DP IV-Inhibitor freigesetzt werden soll und somit bestimmt werden, wo die Wirkung des Inhibitors eintreten soll. Die erfindungsgemäßen Verbindungen oder entsprechende pharmazeutische Zusammensetzungen können also auch zur zell-, gewebs- oder organspezifischen Inhibierung von DP IV eingesetzt werden. Die Gruppen A-B können auch so ausgewählt werden, daß nur solche Enzyme angesprochen werden, die nur vaskulär präsent sind und die die Inhibitoren mit ausreichend hoher Geschwindigkeit freisetzen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß durch die erfindungsgemäßen Verbindungen von instabilen DP IV-Inhibitoren in völlig übberaschender Weise:

1. Eine erhöhte Wirkung der Inhibitoren erreicht werden kann;
2. Die Freisetzung der Inhibitoren je nach Bedarf der Patienten erfolgen kann;
3. Die Freisetzung der Inhibitoren aus den Verbindungen zeitlich gesteuert erfolgen kann;
4. Die Freisetzung der Inhibitoren aus den Verbindungen bezüglich des Freisetzungsorts gesteuert werden kann;
5. Ein Depot von DP IV-Inhibitoren bereitgestellt werden kann; und
6. Die Wirkungsdauer bzw. das Wirkungsende der Initiatoren vom Zeitpunkt ihrer Demaskierung ab genau definiert werden kann.

Erfindungsgemäß werden außerdem pharmazeutische Zusammensetzungen insbesondere zur oralen Verabreichung bereitgestellt, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung gegebenenfalls in Kombination mit üblichen Trägern oder Hilfsstoffen enthält.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen oder sie enthaltende pharmazeutischen Zusammensetzungen können zur Behandlung oder Prophylaxe von Erkrankungen von Säugern eingesetzt werden, die durch Modulation der DP IV-Aktivität eines Säugers behandelt werden können, wie z.B. von Stoffwechselerkrankungen von Menschen.

Insbesondere können sie zur Behandlung von beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern eingesetzt werden.

Durch die vorzugsweise kurze Wirkungsdauer der erfindungsgemäßen instabilen Inhibitoren kann insbesondere eine Beeinflussung von Prozessen im menschlichen oder tierischen Körper minimiert oder verhindert werden, die eine langfristige Inhibierung von DP IV vorraussetzen würden.

Ausführungsbeispiele

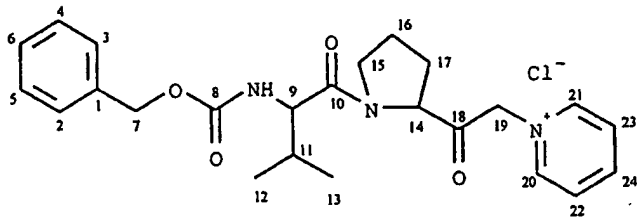
Synthese von instabilen DP IV-Inhibitoren C und erfindungsgemäßen Verbindungen instabiler DP IV-Inhibitoren (A-B-C)

Die Herstellung von instabilen DP IV-Inhibitoren C (entsprechend der allgemeinen Formel A-B-C) wird durch die Beispiele 1.1 und 1.2 belegt. Die Synthese einer erfindungsgemäßen Verbindung instabiler DP IV-Inhibitoren durch das Beispiel 1.3. Die Ausgangsverbindungen, die jeweils korrespondiereden Peptidylchlormethylketone, wurden nach bekannten Verfahren (WEINSTEIN, B., Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, Marcel Dekker, New York, Basel, 1977) hergestellt. Die beispielhaft dargestellten Pyridiniummethylketone unter 1.1 und 1.2 sind als N-terminal geschützte Dipeptidderivate außerordentlich stabil und vollständig charakterisierbar. Die N-terminal deblockierten Dipeptidderivate beginnen bei normaler Luftfeuchte den intramolekularen Zersetzungprozeß unmittelbar nach Deblockierung, so daß keine Schmelzpunkte bestimmbar sind. Die Charakterisierung der Produkte erfolgt mittels HPLC und Massenspektrometrie.

1.1. Synthese von H-Val-Pro-CH_2-($N^+C_5H_5$) / Cl^-

a) Z-Val-Pro-CH_2-($N^+C_5H_5$) / Cl^-

Strukturformel:



Darstellung: 10 mmol Z-Val-Pro-Chlormethylketon werden in Pyridin gelöst und bei 25 °C 5 Tage gerührt. Das überschüssige Pyridin wird bei

2 mbar Vakuum abdestilliert. Das Z-Val-Pro-Pyridiniummethylketon wird noch einer HPLC-Reinigung unterzogen. Die Verbindung ist ein Öl.

Summenformel: $C_{24}H_{30}N_3O_4Cl$

Molmasse: 459.97 Da

Ausbeute: 45.8 % d. Th.

HPLC: Retentionszeit: 2.3 min, LiChrosper 100 RP-18 (125-4), λ = 220 nm, Flußrate 0.5 ml/min, isochratisch 50 % Acetonitril in H_2O (0.1 % TFA)
Retentionszeit: 19.3 min, Nucleosil 7 C_8, λ = 220 nm, Flußrate 8 ml/min, isochratisch 50 % Acetonitril in H_2O (0.1 % TFA)

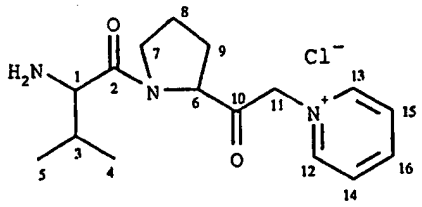
^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ_H: 0.8-1.0 (6H, m, H_{12} u. H_{13}), 1.8-2.1 (3H, m, H_{11} u. H_{16}), 2.2-2.4 (2H, m, H_{17}), 3.4-3.7 (2H, m, H_{15}), 3.7-4.1 (2H, m, H_{20} u. H_{21}), 4.3-4.5 (1H, dd, 5 Hz, 8 Hz, H_9), 4.8-5.1 (2H, m, H_7), 5.8-6.2 (3H, m, H_{14}, H_{19}), 7.2-7.5 (5H, m, H_2-H_6,), 8.2-8.3 (2H, m, H_{22} u. H_{23}), 8.6-8.7 (1H, m, H_{24}), 8.8-9.0 (1H, d, 6 Hz, NH)

^{13}C-NMR (DMSO-d_6) δ_C: 136.8 (C_1), 127.9 (C_2, C_3), 127.8 (C_4,C_5), 128.4 (C_6), 66.7 (C_7), 156.3 (C_8), 57.9 (C_9), 170.8 (C_{10}), 29.7 (C_{11}), 18.5 (C_{12}, C_{13}), 63.7 (C_{14}), 47.2 (C_{15}), 25.1 (C_{16}), 27.9 (C_{17}), 200.3 (C_{18}), 71.1 (C_{19}), 146.1 (C_{20}, C_{21}), 128.3 (C_{22}, C_{23}), 146.4 (C_{24})

MALDI-TOF-MS m/z: 424.6 Da ($M+H^+$, ohne Chloridanion)

b) H-Val-Pro-CH_2-($N^+C_5H_5$) / Cl^-

Strukturformel:



Darstellung: Die Z-Schutzgruppe wird von Z-Val-Pro-CH_2-($N^+C_5H_4$) / Cl^- mittels HBr/eisessig in 5 minütiger Reaktionszeit abgespalten. 1.0 mmol Z-geschütztes Peptid versetzt man mit 2 ml HBr/Eisessig (33 %ig) und läßt es bei 23 °C ca. 10 min rühren. Anschließend wird im Vakuum eingeengt. Das Peptid wird als Hydrobromid mittels Diethylether aus Methanol gefällt, abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

Summenformel: $C_{16}H_{24}N_3O_2Cl$

Molmasse: 325.84 Da

Ausbeute: 97.7 % d. Th.

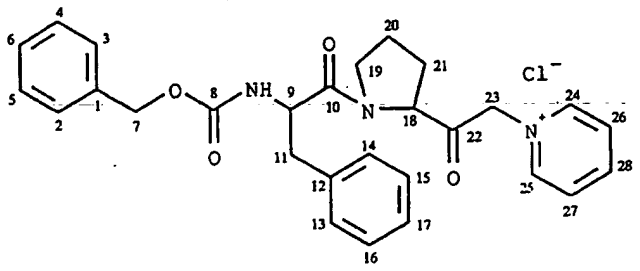
HPLC: Retentionszeit: 7.4 min, LiChrosper 100 RP-18 (125-4), λ = 220 nm, Flußrate 0.5 ml/min, isochratisch 50 % Acetonitril in H_2O (0.1 % TFA)

MALDI-TOF-MS m/z: 291.2 Da ($M+H^+$, ohne Chloridanion)

1.2. Synthese von H-Phe-Pro-CH_2-($N^+C_5H_5$) / Cl^-

a) Z-Phe-Pro-CH_2-($N^+C_5H_5$) / Cl^-

Strukturformel:



Darstellung: 10 mmol Z-Phe-Pro-Chlormethylketon werden mit 2 ml Pyridin versetzt. Es wird 4 Tage bei 23 °C gerührt. Das überschüssige Pyridin wird bei 2 mbar Vakuum abdestilliert. Das Rohprodukt wird über 60 g Kieselgel gereinigt. Im Eluat Chloroform/Methanol wird anfangs (9:1 Vol.-Teile) das Produkt und mit zunehmender Polarität des Eluenten das Chlormethylketon aufgefangen. Z-Phe-Pro-Pyridiniummethylketon wird abschließend einer HPLC-Reinigung unterzogen.

Summenformel: $C_{28}H_{30}N_3O_4Cl$

Molmasse: 508.01 Da

Ausbeute: 69.6 % d. Th.

HPLC: Retentionszeit: 17 min, LiChrosorb RP 8 (Hibar), λ = 220 nm, Flußrate 8.0 ml/min, isochratisch 50 % Acetonitril in H_2O (0.1 % TFA)

Retentionszeit: 3.4 min, LiChrosper RP-8 (125*4),
λ = 220 nm, Flußrate 1.5 ml/min, Gradient 30-80 % Acetonitril in H_2O (0.1 % TFA) in 25 min

Retentionszeit: 10.2 min, Nucleosil 7 C_8, λ = 220 nm, Flußrate 8 ml/min, isochratisch 50 % Acetonitril in H_2O (0.1 % TFA)

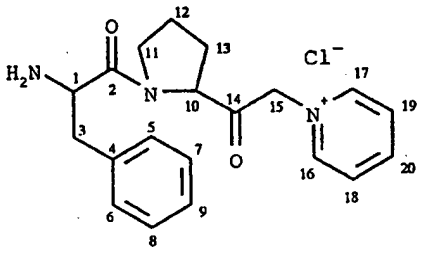
^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ_H: 1.7-2.1 (4H, m, H_{20}, H_{21}), 2.7-3.0 (2H, m, H_{11}), 3.4-3.9 (2H, m, H_{19}), 4.4-4.6 (1H, m, H_9), 4.6-4.8 (2H, m, H_{24}, H_{25}), 5.0-5.1 (2H, dd, H_7), 5.7-5.8 (1H, d, H_{18}), 5.9-6.1 (2H, dd, H_{23}), 7.2-7.4 (10H, m, H_2-H_6, H_{13}-H_{17}), 8.6-8.8 (1H, dd, H_{28}), 8.2-8.3 (2H, d, H_{26} u. H_{27}), 8.8-8.9 (1H, d, NH)

^{13}C-NMR (DMSO-d_6) δ_C: 136.8(C_1), 127.9(C_2, C_3), 127.6 (C_4,C_5), 128.4 (C_6), 65.5 (C_7), 156.3 (C_8), 54.1 (C_9), 170.9 (C_{10}), 36.4 (C_{11}), 137.6 (C_{12}), 126.6 (C_{13}, C_{14}), 128.4 (C_{15}, C_{16}), 129.3 (C_{17}), 63.1 (C_{18}), 46.9 (C_{19}), 25.1 (C_{20}), 27.6 (C_{21}), 200.7 (C_{22}), 66.3 (C_{23}), 146.2 (C_{24}, C_{25}), 128.2 (C_{26}, C_{27}), 146.4 (C_{28})

MALDI-TOF-MS m/z: 472.8 Da ($M+H^+$, ohne Chloridanion)

b) H-Phe-Pro-CH_2-($N^+C_5H_5$) / Cl^-

Strukturformel:



Darstellung: Die Z-Schutzgruppe wird von Z-Phe-Pro-CH_2-($N^+C_5H_4$) / Cl^- nach in 5 minütiger Reaktionszeit abgespalten. 1.0 mmol Z-geschütztes Peptid versetzt man mit 2 ml HBr/Eisessig (33 %ig) und läßt es bei 23 °C ca. 10 min rühren. Anschließend wird im Vakuum eingeengt. Das Peptid wird als Hydrobromid mit Diethylether gefällt, abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

Summenformel: $C_{20}H_{24}N_3O_2Cl$

Molmasse: 373.88 Da

Ausbeute: 98 % d. Th.

HPLC: Retentionszeit: 6.9 min, LiChrosper 100 RP-18 (125-4), λ = 220 nm, Flußrate 0.5

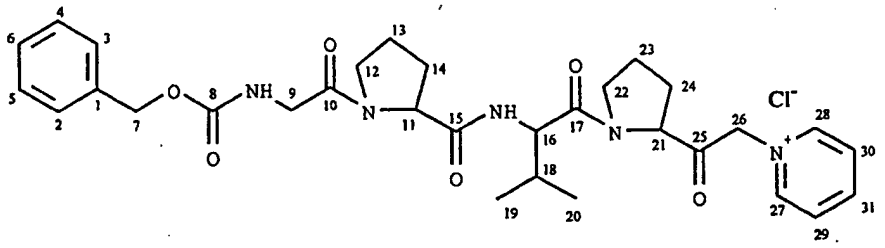
ml/min, isochratisch 50 % Acetonitril in H_2O (0.1 % TFA)

MALDI-TOF-MS m/z: 337.2 Da ($M+H^+$, ohne Chloridanion)

1.3. Synthese von H-Gly-Pro-Val-Pro-CH_2-($N^+C_5H_5$) / Cl^-

a) Z-Gly-Pro-Val-Pro-CH_2-($N^+C_5H_5$) / Cl^-

Strukturformel:



Darstellung: 10 mmol Z-Gly-Pro-Val-Pro-Chlormethylketon werden mit 2 ml Pyridin versetzt. Es wird 4 Tage bei 23 °C gerührt. Das überschüssige Pyridin wird bei 2 mbar Vakuum abdestilliert. Z-Gly-Pro-Val-Pro-pyridiniummethylketon wird einer HPLC-Reinigung unterzogen.

Summenformel: $C_{31}H_{40}N_5O_6Cl$

Molmasse: 614.14 Da

HPLC: Retentionszeit: 17.4 min, LiChrosorb RP 8 Hibar, λ = 220 nm, Flußrate 8 ml/min, isochratisch 50 % Acetonitril in H_2O (0.1 % TFA)

Retentionszeit: 5.4 min, LiChroCART 100 RP-18 (250-4), λ = 220 nm, Flußrate 0.5 ml/min, isochratisch 50 % Acetonitril in H_2O (0.1 % TFA)

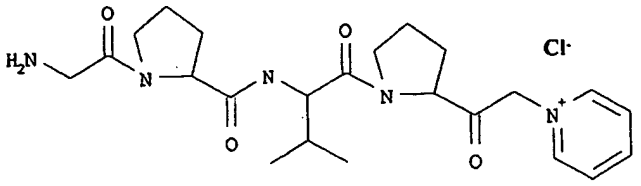
Retentionszeit: 17.7 min, Nucleosil 100 7 C_8, λ = 220 nm, Flußrate 5 ml/min, isochratisch 50 % Acetonitril in H_2O (0.1 % TFA)

^{13}C-NMR (DMSO-d_6) δ_C: 134.4 (C_1), 128.9 (C_2, C_3), 128.2 (C_4, C_5), 129.8 (C_6), 65.3 (C_7), 157.2 (C_8), 39.0 (C_9), 165.7 (C_{10}), 56.0 (C_{11}), 41.6 (C_{12}), 24.6 (C_{13}), 29.0 (C_{14}), 170.5 (C_{15}), 52.1 (C_{16}), 171.9 (C_{17}), 30.3 (C_{18}), 18.6, 19.3 (C_{19}, C_{20}), 58.9 (C_{21}), 47.2 (C_{22}), 25.0 (C_{23}), 29.4 (C_{24}), 196.5 (C_{25}), 65.8 (C_{26}), 137.9 (C_{27}, C_{28}), 129.1 (C_{29}, C_{30}), 146.5 (C_{31})

MALDI-TOF-MS m/z: 579.7 Da ($M+H^+$, ohne Chloridanion)

b) H-Gly-Pro-Val-Pro-CH_2-($N^+C_5H_5$) / Cl^-

Strukturformel:



Darstellung: Die Z-Schutzgruppe wird von Z-Phe-Pro-CH_2-($N^+C_5H_4$) / Cl^- nach in 5 minütiger Reaktionszeit abgespalten. 1.0 mmol Z-geschütztes Peptid versetzt man mit 2 ml HBr/Eisessig (33 %ig) und läßt es bei 23 °C ca. 10 min rühren. Anschließend wird im Vakuum eingeengt. Das Peptid wird als Hydrobromid mit Diethylether gefällt, abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

Summenformel: $C_{23}H_{34}N_5O_4Cl$

Molmasse: 480,0 Da

Ausbeute: 95 % d. Th.

MALDI-TOF-MS m/z: 443,9 Da ($M+H^+$, ohne Chloridanion)

1. Abbau instabiler DP IV-Inhibitoren und ihrer maskierten Formen in wässriger Lösung

Zur Analyse der Stabilität der unter 1.1 und 1.2 dargestellten Inhibitoren wurden diese in wässriger Pufferlösung inkubiert und ihre intramolekulare Zyklisierungsreaktion mit Hilfe von MALDI-TOF Massenspektrometrie verfolgt (Abbildungen 2 und 3). Die Produkte dieser Reaktion ergeben die jeweiligen Pyrazinderivate (Abbildung 1).

Der Abbau von H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon mit dem Molekulargewicht 337.2 Da vollzieht sich unter Wasserabspaltung zum zyklischen Pyrazinderivat mit dem Molekulargewicht 319.2 Da quantitativ innerhalb von 30 Minuten (Abbildung 2).

Der Abbau von H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon mit dem Molekulargewicht 291.2 Da vollzieht sich unter Wasserabspaltung zum zyklischen Pyrazinderivat mit dem Molekulargewicht 273.2 Da quantitativ innerhalb von 60 Minuten (Abbildung 3).

Die während der intramolekularen Reaktion erfolgende Ausbildung des Doppelbindungssystems des Pyrazins ermöglicht die quantitative Analyse des Zyklisierungvorganges mittels UV-Spektrometrie (Abbildung 4). Die daraus ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für die intramolekulare Zyklisierung der instabilen DP IV-Inhibitoren in 0.1 M HEPES-Puffer, pH = 7.6, 25° C, sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Parameter der Zyklisierung instabiler DP IV-Inhibitoren

Verbindung	$k\ min^{-1}$	Halbwertszeit

		(min)
H-Val-Pro-CH_2-($N^+C_5H_5$)	$8,7 * 10^{-4}$ ($\pm 4*10^{-5}$)	13,3
H-Phe-Pro-CH_2-($N^+C_5H_5$)	$1,2 * 10^{-3}$ ($\pm 3,9*10^{-5}$)	9,6

Im Gegensatz dazu erwiesen sich die erfindungsgemäßen Verbindungen H-Val-Pro-CH_2-($N^+C_5H_5$) und H-Gly-Pro-Val-Pro-CH_2-($N^+C_5H_5$) über 24 Stunden unter gleichen Bedingungen als völlig stabil.

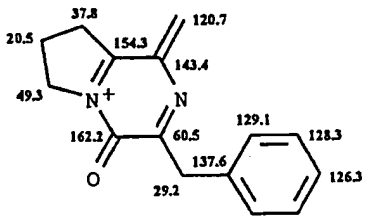
2. **Wechselwirkung instabiler DP IV-Inhibitoren bzw. erfindungsgemäße Verbindungen mit Dipeptidyl Peptidase IV in wässriger Lösung**

Inkubiert man das Targetenzym DP IV mit instabilen Inhibitoren in Gegenwart eines Substrates, so ist initial eine Hemmung des Enzyms zu beobachten, die durch die parallel verlaufende intramolekulare Zyklisierung des Inhibitors mit fortschreitender Versuchszeit wieder nachläßt, da die Konzentration des Inhibitors in der Reaktionslösung durch die spontan verlaufende chemische Reaktion abnimmt. Dieser Effekt ist in den Abbildungen 5 und 6 dargestellt. Durch die zeitabhängige Konzentrationsabnahme des Inhibitors nimmt die Geschwindigkeit der enzymkatalysierten Hydrolyse des Substrates mit fortschreitender Zeit wieder zu.

Im Gegensatz zu den unmaskierten DP IV-Inhibitoren erweist sich die erfindungsgemäße Verbindung H-Gly-Pro-Val-Pro-CH_2-($N^+C_5H_5$) über 24 Stunden in gepufferter wäßriger Lösung in Abwesenheit eines Enzyms als stabil. Erst durch die Zugabe des Enzyms DP IV (hier exemplarisch auch zur Freisetzung des DP IV-Inhibitors genutzt) wird unter Abspaltung des N-terminalen Dipeptides H-Gly-Pro-OH der aktive DP IV-Inhibitor H-Val-Pro-CH_2-($N^+C_5H_5$) freigesetzt. Im Massenspektrum (Abbildung 7) sind

demzufolge selbst nach 60 Minuten Inkubationszeit noch deutlich mehr als 50% der inkubierten erfindungsgemäßen Verbindung zu erkennen. Aufgrund dieser retardierten Freisetzung wird neben der gewünschten effektiven Inhibierung des Zielenzyms überraschenderweise auch eine deutlich verlängerte Wirksamkeit bei deutlich verminderter Konzentration der erfindungsgemäßen Verbindung gegenüber den instabilen DP IV-Inhibitoren beobachtet (Abbildung 8).

^{13}C-NMR-Daten



^{1}H-NMR-Daten

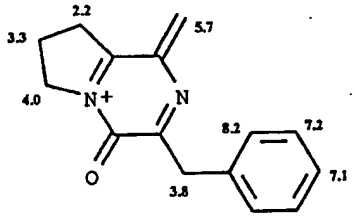


Abbildung 1: Strukturformel des Produktes der intramolekularen Zyklisierungs von H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon. Die charakteristischen chemischen Verschiebungen (in ppm) ermittelt mittels ^{13}C-NMR- und ^{1}H-NMR sind den entsprechenden Atomen zugeordnet.

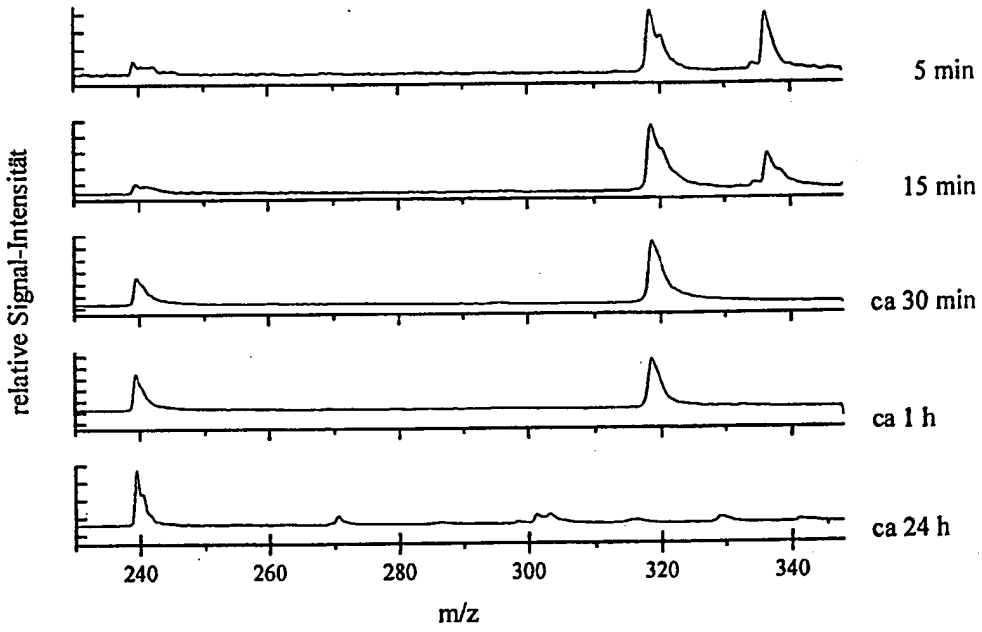


Abbildung 2: MALDI-TOF-Massenspektren der Zyklisierung von H-Phe-Pro-Pyridinium Methylketon in wässeriger Pufferlösung pH = 7.6, aufgenommen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

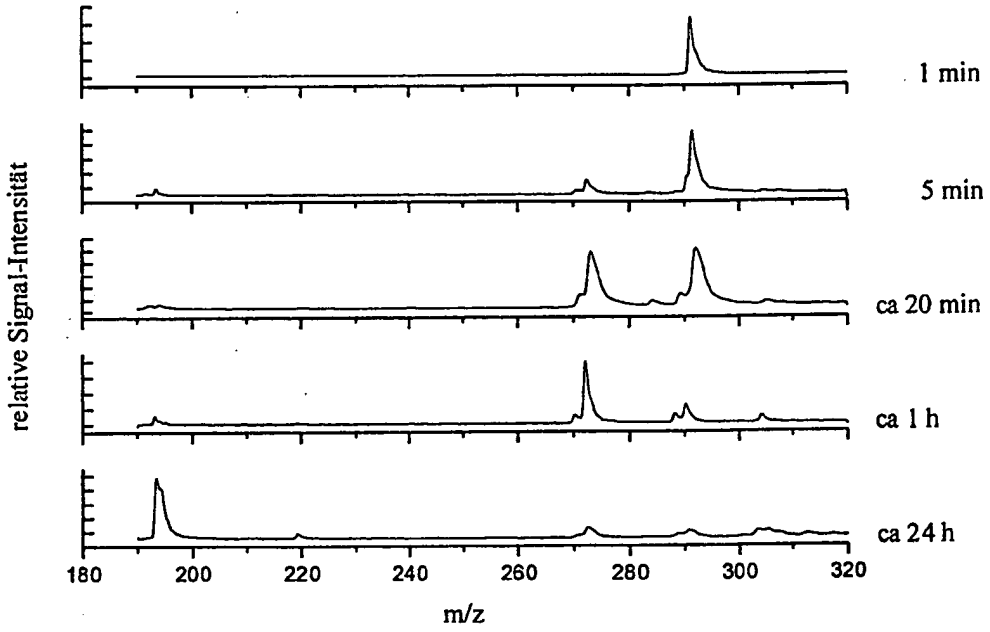


Abbildung 3: MALDI-TOF-Massenspektren der Zyklisierung von H-Val-Pro-Pyridinium Methylketon in wässeriger Pufferlösung pH = 7.6, aufgenommen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

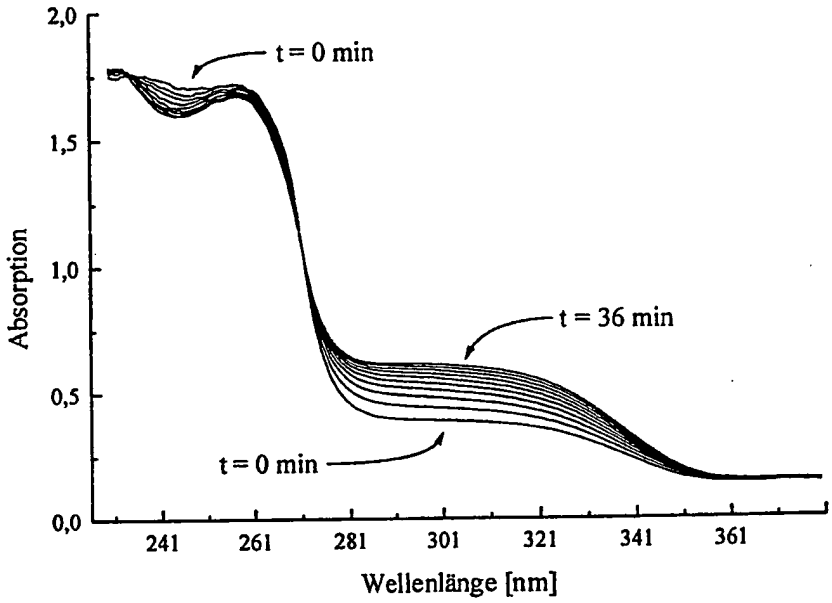


Abbildung 4: UV-Spektren einer wässrigen Lösung von H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon inkubiert in 0.1 M HEPES-Puffer, pH = 7.6, bei 30° C. Die Zyklisierungsreaktion wurde innerhalb von 40 min verfolgt.

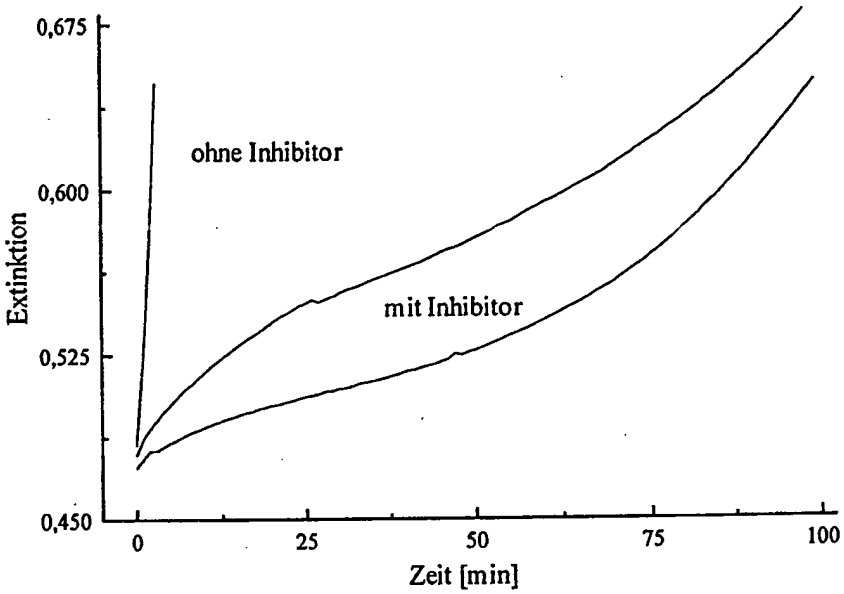


Abbildung 5: Progresskurven der DP IV-katalysierten Hydrolyse des Substrates H-Gly-Pro-*p*NA in Gegenwart von $2.8 \cdot 10^{-3}$ M H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon, 0.06 µg/ml DP IV, $4 \cdot \cdot 10^{-4}$ M H-Gly-Pro-*p*NA im Ansatz, 0.1 M HEPES-Puffer, pH = 7.6, 30° C.

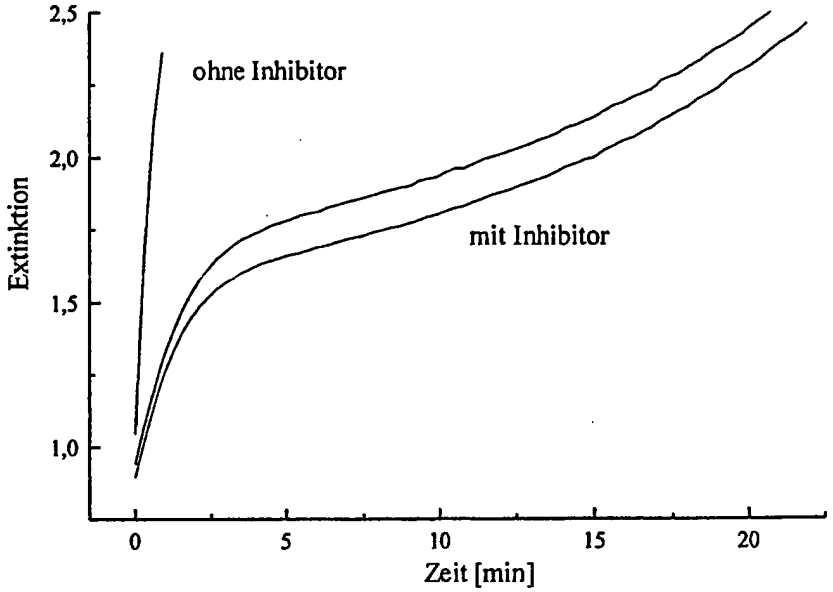


Abbildung 6: Progresskurven der DP IV-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-*p*NA in Gegenwart von $2.1 \cdot 10^{-4}$ M H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon, 0.06 µg/ml DP IV, $1.0 \cdot 10^{-3}$ mol/l H-Gly-Pro-*p*NA im Ansatz, 0.1 M HEPES-Puffer, pH = 7.6, 30° C.

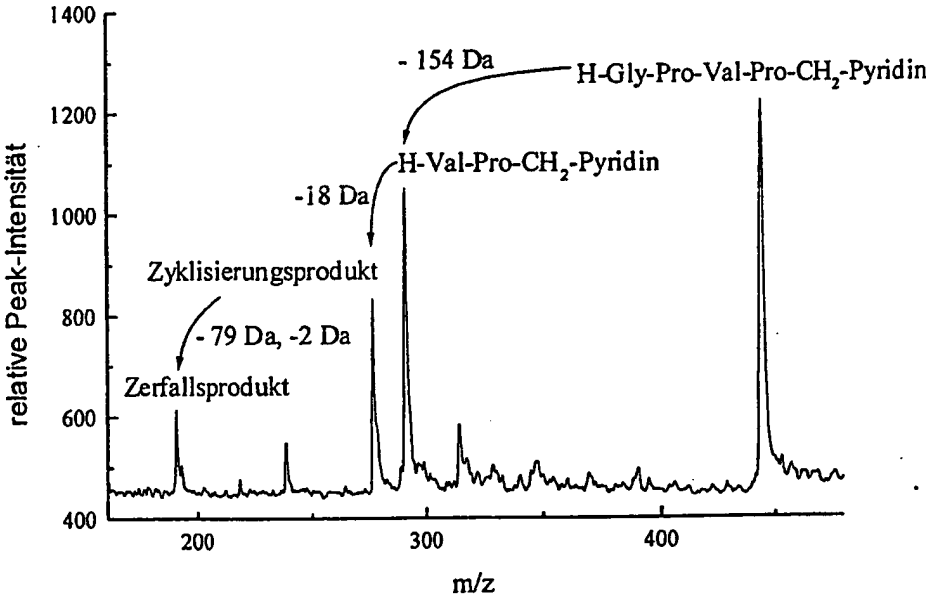


Abbildung 7: MALDI-TOF-Massenspektrum des Inkubationsansatzes der DP IV-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-*p*NA in Gegenwart von $2.6 \cdot 10^{-5}$ mol/l H-Gly-Pro-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon, 0.06 µg/ml DP IV, $2.0 \cdot 10^{-4}$ mol/l H-Gly-Pro-*p*NA, 0.1 M HEPES-Puffer, pH = 7.6, 30° C. Aufgenommen nach 60 min Inkubationszeit.

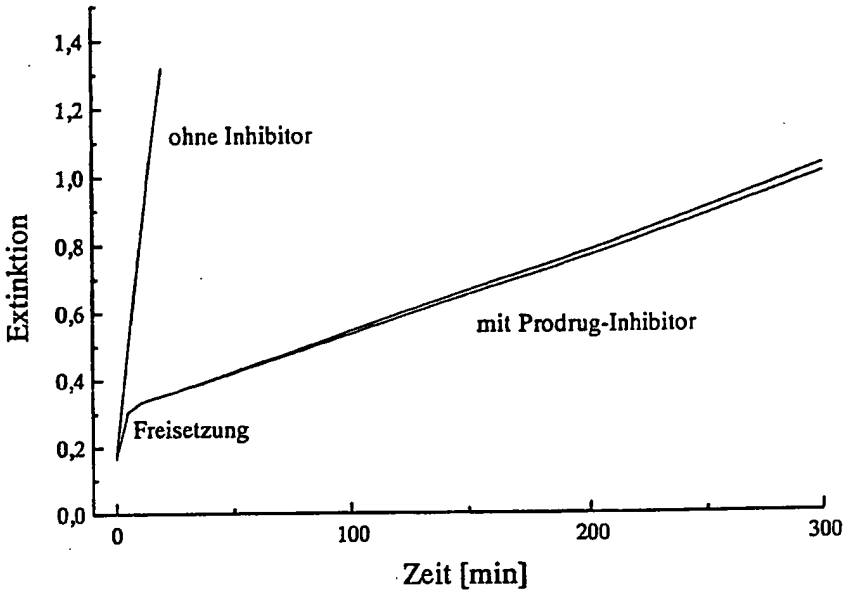


Abbildung 8: Progresskurven der DP IV-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-*p*NA in Gegenwart von $2.6 \cdot 10^{-5}$ mol/l H-Gly-Pro-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon, 0.06 µg/ml DP IV, $2.0 \cdot 10^{-4}$ H-Gly-Pro-*p*NA mol/l im Ansatz, 0.1 M HEPES-Puffer, pH = 7.6, 30° C.

Patentansprüche

1. Verbindungen von Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV), welche Verbindungen die allgemeine Formel A-B-C aufweisen, wobei

A eine Aminosäure
B die chemische Bindung zwischen A und C oder eine Aminosäure, und
C ein instabiler Inhibitor von DP IV ist.

2. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß B Prolin, Hydroxyprolin, Thiazolidincarbonsäure, Dehydroprolin, Pipecolinsäure, Azetidincarbonsäure oder Aziridincarbonsäure ist.

3. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß B Prolin oder Hydroxyprolin ist.

4. Verbindungen nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß C ein Dipeptidderivat ist, das am C-Terminus eine aktive Carbonylgruppe aufweist, wie ein Dipeptidyl-Alkylketon-Derivat.

5. Verbindungen nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß C ein Dipeptidylchloralkylketon-, eine Dipeptidylboronsäure-, ein Dipeptidylcyanid- oder ein Dipetidylpyridiniummethylketonrest ist.

6. Verbindungen nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Inhibitoren in Salzform vorliegen.

7. Verbindungen nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß A-B ein Dipeptid der Formel Ile-Pro oder Gly-Pro ist.

8. Pharmazeutische Zusammensetzung insbesondere zur oralen Verabreichung, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens eine Verbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche gegebenenfalls in Kombination mit üblichen Trägern oder Hilfsstoffen enthält.

9. Verwendung von Verbindungen oder pharmazeutischen Zusammensetzungen nach einem der vorstehenden Ansprüche zur Herstellung eines Medikaments zur zeitlich gesteuerten in vivo Inhibierung von DP IV.

10. Verwendung von Verbindungen oder pharmazeutischen Zusammensetzungen nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur zell-, gewebs- oder organspezifischen Inhibierung von DP IV.

11. Verwendung von Verbindungen oder pharmazeutischen Zusammensetzungen nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Behandlung von Erkrankungen von Säugern, die durch Modulation der DP IV-Aktivität eines Säugers behandelt werden können.

12. Verwendung nach Anspruch 10 zur Behandlung von Stoffwechselerkrankungen von Menschen.

13. Verwendung nach Anspruch 10 zur Behandlung von beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Ir ational Application No
PCT/EP 99/04381

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K5/083 A61K38/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 08259 A (NEW ENGLAND MEDICAL CENTER INC ;UNIV TUFTS (US)) 29 April 1993 (1993-04-29) page 2, line 18 - line 35 page 6, line 4 -page 7, line 19; claims page 15, line 6 - line 19 page 21, line 4 - line 30 ---	1-5,7-12
X	WO 95 11689 A (TUFTS COLLEGE ;BACHOVCHIN WILLIAM W (US)) 4 May 1995 (1995-05-04) page 2, line 16 - line 32 page 8, line 20 -page 9, line 5 page 15, line 15 - line 29; claims ---	1-5,7-12
A	DE 196 16 486 A (HANS KNOELL INST FUER NATURSTO) 30 October 1997 (1997-10-30) cited in the application the whole document ---	1,8-13
	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
5 October 1999	15/10/1999

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fuhr, C

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropnate. of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	J. LIN ET AL.: "Inhibition of dipeptidyl peptidase IV by fluoroolefin-containing n-peptidyl-O-hydroxylamine peptidomimetics" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 95, November 1998 (1998-11), pages 14020-14024, XP002117450 WASHINGTON US page 14023, right-hand column, paragraph 3 -page 14024, left-hand column, paragraph 1	1

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 9904381

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although Claims Nos. 10-13 relate to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See supplemental sheet Additional Matter PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

In view of the wording of the present patent claims which makes it more difficult if not altogether impossible to determine the scope for which protection is sought, the present patent application does not, to a certain extent, comply with the requirements of PCT Article 6 (cf. also PCT Rule 6.1(a)) thus making a meaningful search unfeasible. The concept 'unstable inhibitor' is especially unclear. This concept is not defined in the description even though the difference between stabile and unstable inhibitors appears to be expressly required under the terms of the application (for example over the plasma half life).
For this reason, the search was directed at the sections of the patent claims which appear to be supported and disclosed in the above-mentioned sense, namely at the sections pertaining to the compounds as cited in the examples i.e. including closely related homogeneous compounds.

The applicant is therefore advised that patent claims or sections of patent claims laid to inventions for which no international search report was drafted cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). Similar to the authority entrusted with the task of carrying out the international preliminary examination, the EPO also does not generally carry out a preliminary examination of subject matter for which no search has been conducted. This is also valid in the case when the patent claims have been amended after receipt of the international search report (PCT Article 19), or in the case when the applicant submits new patent claims pursuant to the procedure in accordance with PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Ir ·ational Application No
PCT/EP 99/04381

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9308259 A	29-04-1993	CA 2121369 A	29-04-1993
		EP 0610317 A	17-08-1994
		JP 7504158 T	11-05-1995
		US 5462928 A	31-10-1995
WO 9511689 A	04-05-1995	NONE	
DE 19616486 A	30-10-1997	AU 3023397 A	19-11-1997
		CA 2252576 A	06-11-1997
		CN 1216468 A	12-05-1999
		WO 9740832 A	06-11-1997
		EP 0896538 A	17-02-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/04381

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07K5/083 A61K38/06

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 93 08259 A (NEW ENGLAND MEDICAL CENTER INC ;UNIV TUFTS (US)) 29. April 1993 (1993-04-29) Seite 2, Zeile 18 - Zeile 35 Seite 6, Zeile 4 -Seite 7, Zeile 19; Ansprüche Seite 15, Zeile 6 - Zeile 19 Seite 21, Zeile 4 - Zeile 30 ---	1-5,7-12
X	WO 95 11689 A (TUFTS COLLEGE ;BACHOVCHIN WILLIAM W (US)) 4. Mai 1995 (1995-05-04) Seite 2, Zeile 16 - Zeile 32 Seite 8, Zeile 20 -Seite 9, Zeile 5 Seite 15, Zeile 15 - Zeile 29; Ansprüche --- -/--	1-5,7-12

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
5. Oktober 1999	15/10/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Fuhr, C

2

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 196 16 486 A (HANS KNOELL INST FUER NATURSTO) 30. Oktober 1997 (1997-10-30) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1,8-13
P,A	J. LIN ET AL.: "Inhibition of dipeptidyl peptidase IV by fluoroolefin-containing n-peptidyl-O-hydroxylamine peptidomimetics" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd. 95, November 1998 (1998-11), Seiten 14020-14024, XP002117450 WASHINGTON US Seite 14023, rechte Spalte, Absatz 3 -Seite 14024, linke Spalte, Absatz 1	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/04381

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 10-13 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführen Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

2. ☒ Ansprüche Nr. –
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210 .

3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Angesichts des Wortlauts der geltenden Patentansprüche, welche es damit erschwert wenn nicht gar unmöglich macht, den durch sie erstrebten Schutzumfang zu bestimmen, entspricht die vorliegende Patentanmeldung den Anforderungen des Artikels 6 PCT (vgl. auch Regel 6.1(a) PCT) in einem Maße nicht, daß eine sinnvolle Recherche undurchführbar ist. Besonders unklar ist hierbei der Begriff 'instabiler Inhibitor'. Dieser Begriff wird in der Beschreibung nicht definiert, obwohl die Abgrenzung von stabilen und instabilen Inhibitoren im Sinne der Anmeldung (beispielsweise über die Plasmahalbwertszeit) dringend erforderlich erscheint.
Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend, die Verbindungen, wie sie in den Ausführungsbeispielen angegeben sind, einschliesslich nahverwandter homogener Verbindungen.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veroffentlic ...en. die zur selben Patentfamilie genoren

In... ticnales Aktenzeichen
PCT/EP 99/04381

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9308259 A	29-04-1993	CA 2121369 A	29-04-1993
		EP 0610317 A	17-08-1994
		JP 7504158 T	11-05-1995
		US 5462928 A	31-10-1995
WO 9511689 A	04-05-1995	KEINE	
DE 19616486 A	30-10-1997	AU 3023397 A	19-11-1997
		CA 2252576 A	06-11-1997
		CN 1216468 A	12-05-1999
		WO 9740832 A	06-11-1997
		EP 0896538 A	17-02-1999